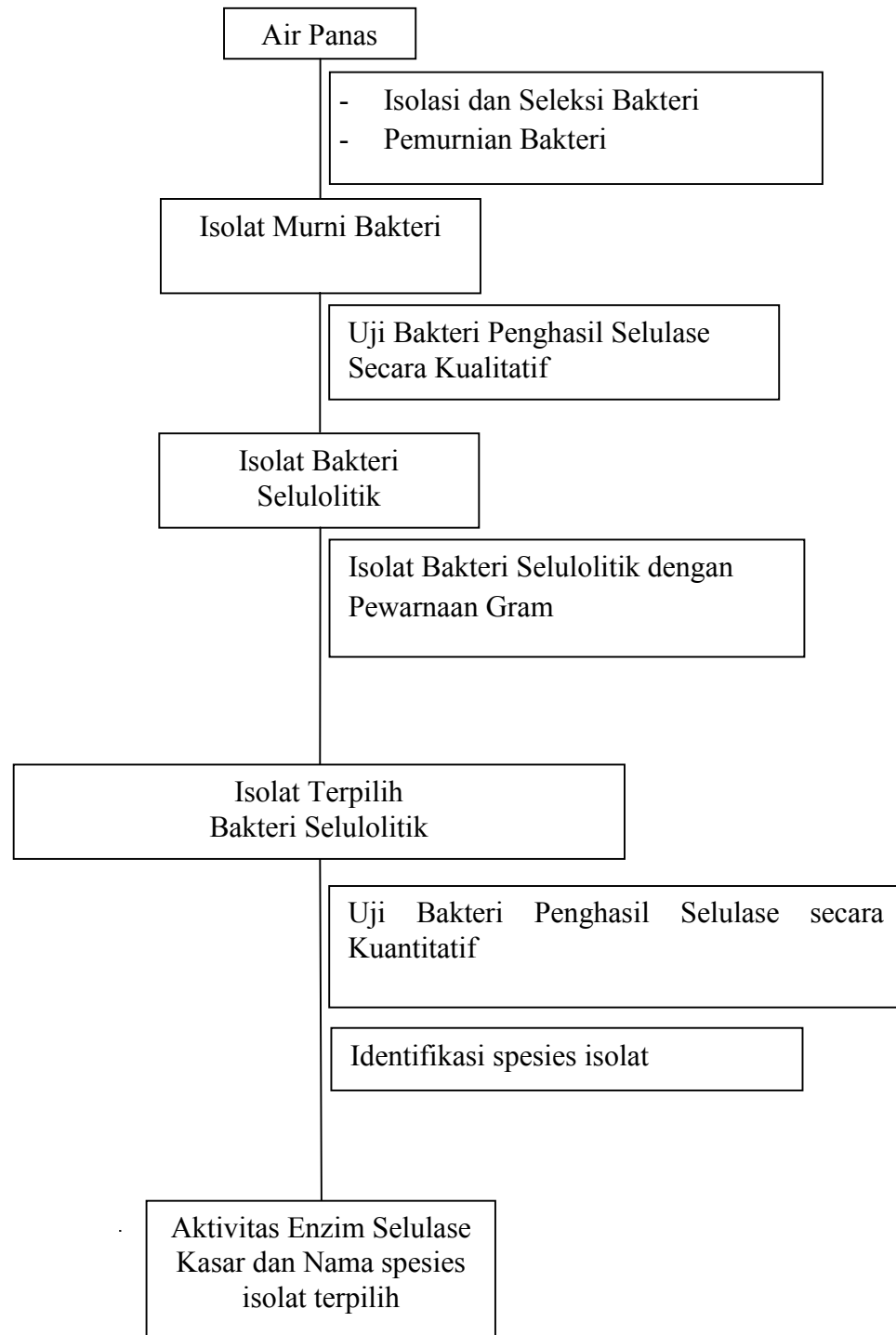
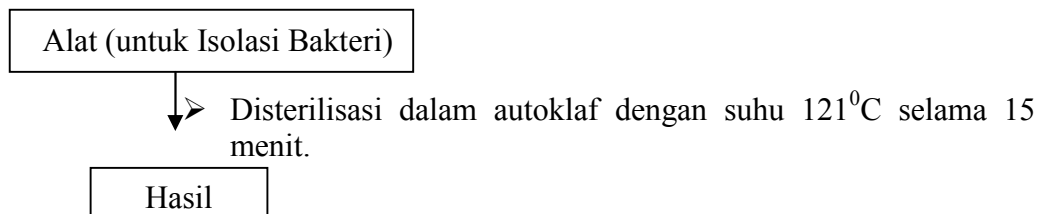


## Lampiran 1. Metode Kerja

### L.1.1 Bagan kerja

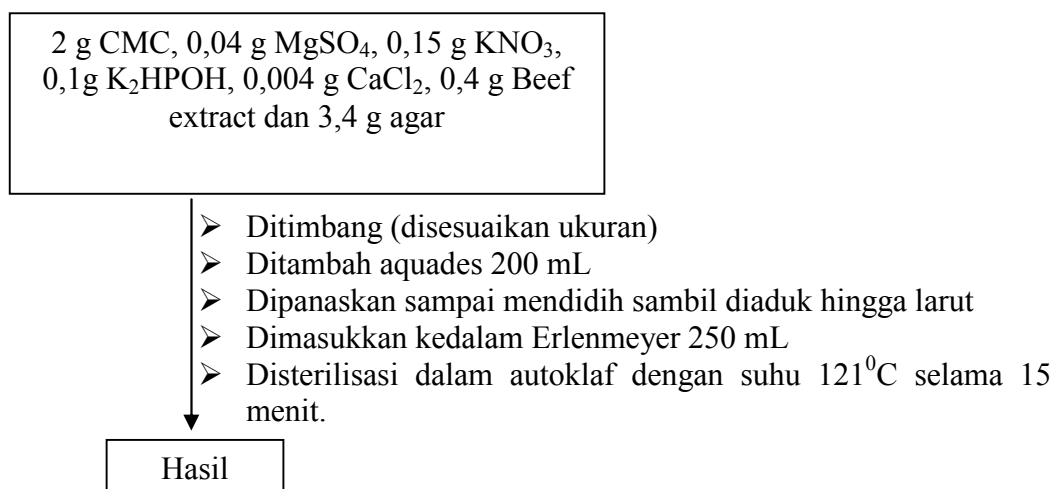


### L.1.2 Tahap Preparasi Alat dan Bahan

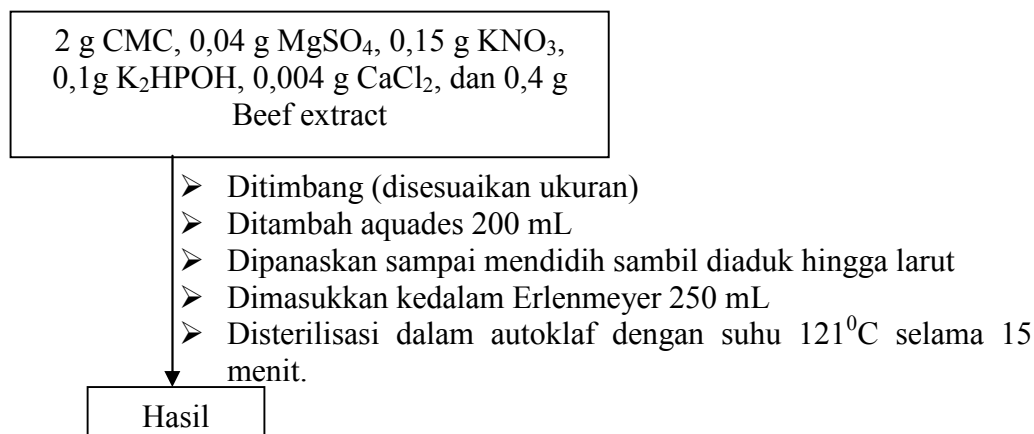


### L.1.3 Pembuatan Media

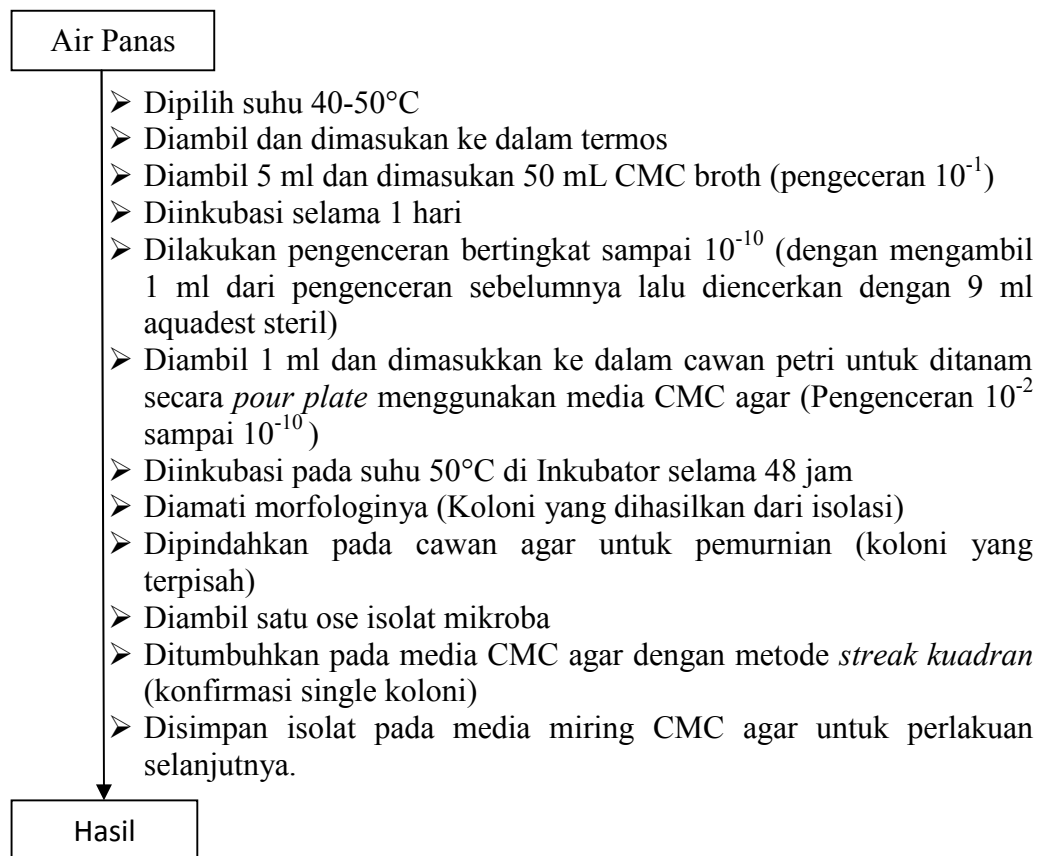
#### L.1.3.1 Media *Carboxil Methil Cellulosa (CMC)* agar



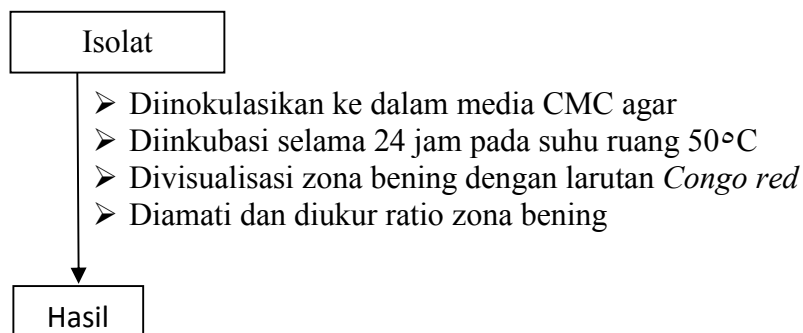
#### L.1.3.2 Media *Carboxil Methil Cellulosa (CMC)* broth



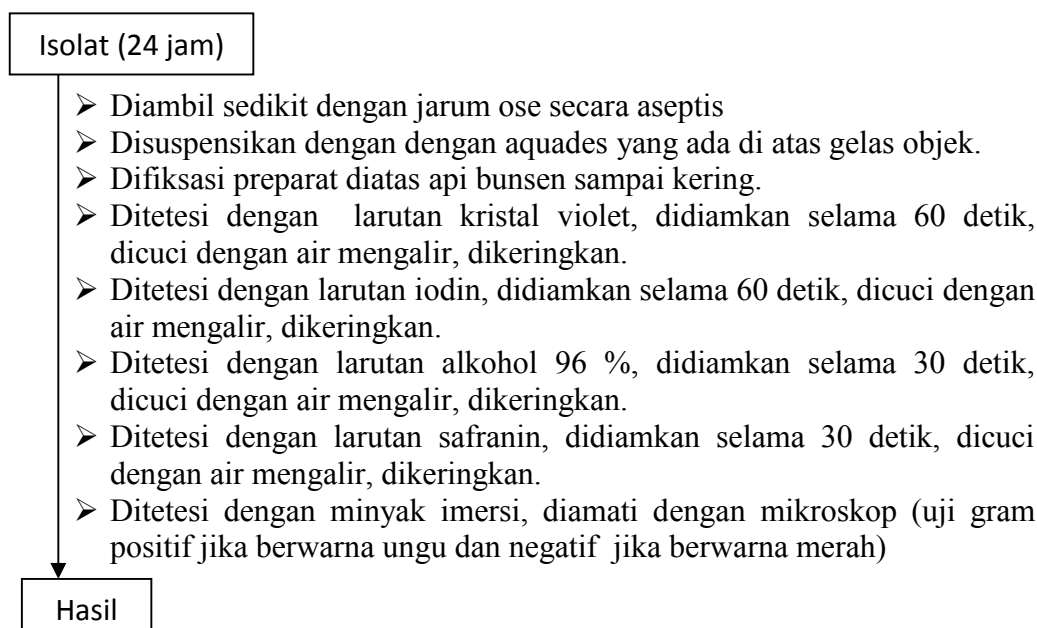
#### L.1.4 Isolasi Bakteri



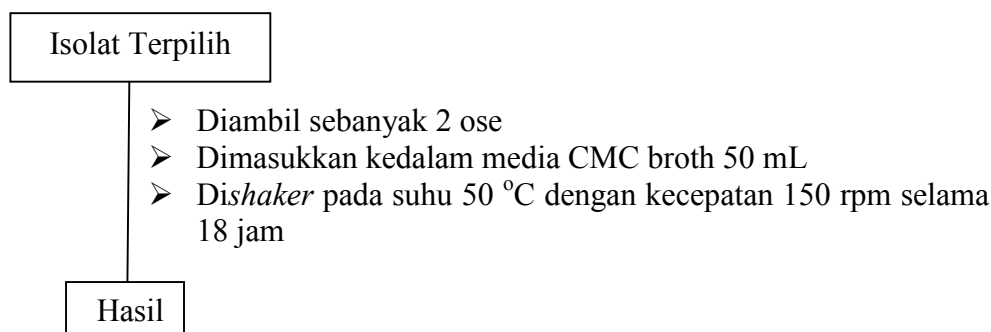
#### L.1.5 Uji Zona Bening



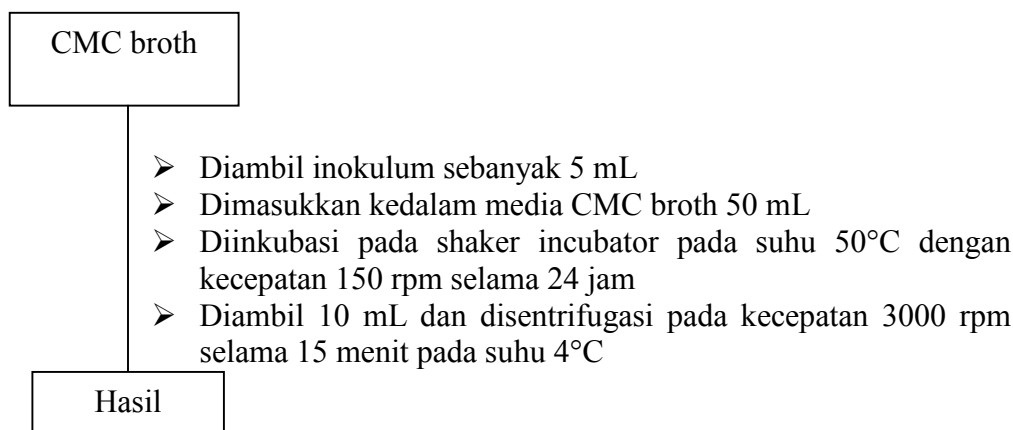
### L.1.6 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1999).



### L.1.7 Pembuatan Inokulum bakteri Selulolitik Termofilik

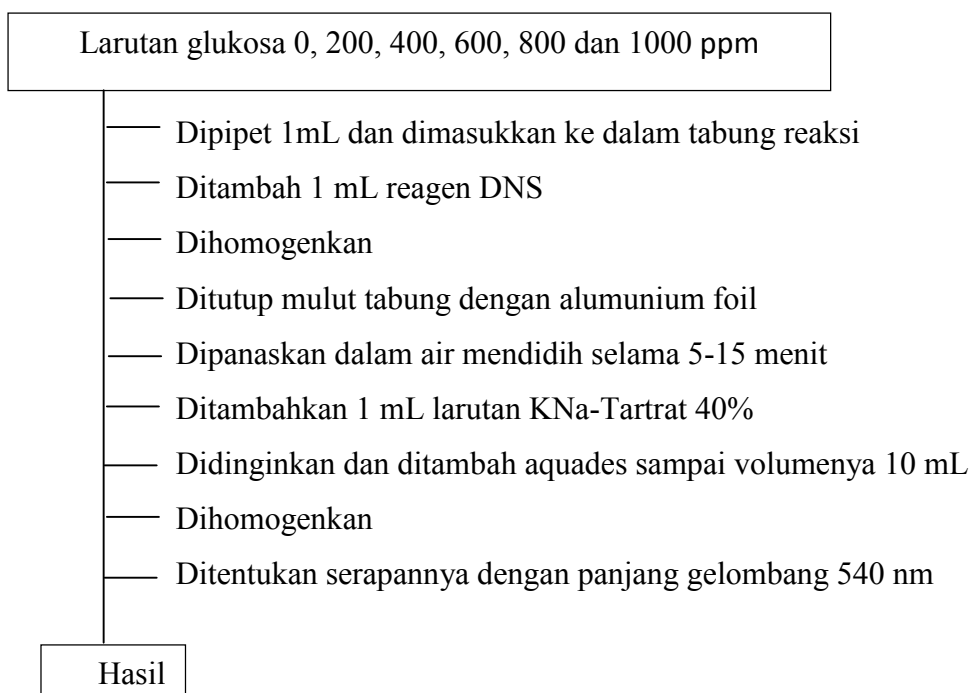


### L.1.8 Produksi Enzim Selulase Kasar

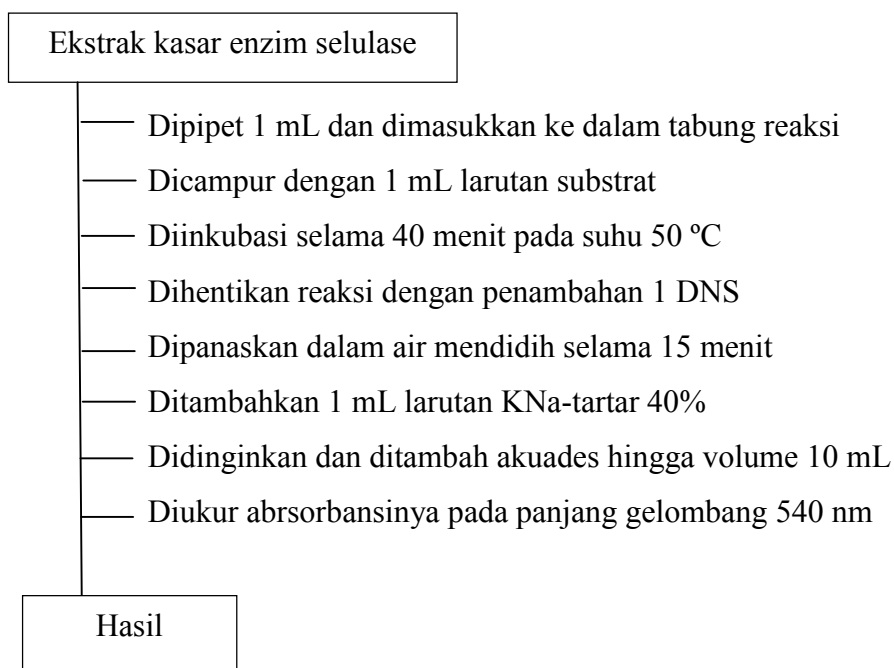


### **L.1.9 Analisis Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS (Miller, 1959).**

#### **L.1.9.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa**



#### **L.1.10 Analisa Glukosa**



## Lampiran 2. Pembuatan Reagen

### L.2.1 Pembuatan Media CMC

Pembuatan media CMC agar dan CMC broth yang terdiri dari 2 g CMC, 0,04 g  $\text{MgSO}_4$ , 0,15 g  $\text{KNO}_3$ , 0,1g  $\text{K}_2\text{HPOH}$ , 0,004 g  $\text{CaCl}_2$ , dan 0,4 g Beef extract dan untuk media CMC agar bahan-bahan tersebut ditambah 3,4 gram agar. Semua bahan dicampur dengan aquadest sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut pada alat hotplate dan stirer, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

### L.2.2 Pembuatan Larutan Standart Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standart 5000 ppm adalah :

$$5000 \text{ ppm} = \frac{5000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{5 \text{ g}}{1 \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan standart 5000 ppm diperlukan 0,5 g glukosa, dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200,400, 600, 800, 1000 ppm sebanyak 100 mL dibuat sesuai dengan menggunakan rumus pengenceran sebagaimana berikut :

a. Konsentrasi 200 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 200 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 400 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 400 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 600 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 600 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 12 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 800 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 800 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 16 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 1000 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 20 \text{ mL}$$

### **L.2.3 Pembuatan Reagen DNS (Miller, 1959)**

Ditimbang asam 3-5 dinitrisalisilat sebanyak 1 gram, 0,2 gram fenol, 0,05 gram sodium sulfit, dan 1 gram natrium hidroksida. Kemudian semua bahan dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL dan ditera. Sebanyak 1 mL garam Rochelle 40 % ditambahkan segera setelah terbentuknya kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis . Hasil disimpan dalam botol warna gelap.

### **L.2.4 Pembuatan Reagen KNa-Tartar 40%**

Ditimbang KNa-Tartar sebanyak 20 gram kemudian dilarutkan dengan akuades 50 mL dalam erlenmeyer 250 mL. Hasil disimpan dalam botol warna gelap.

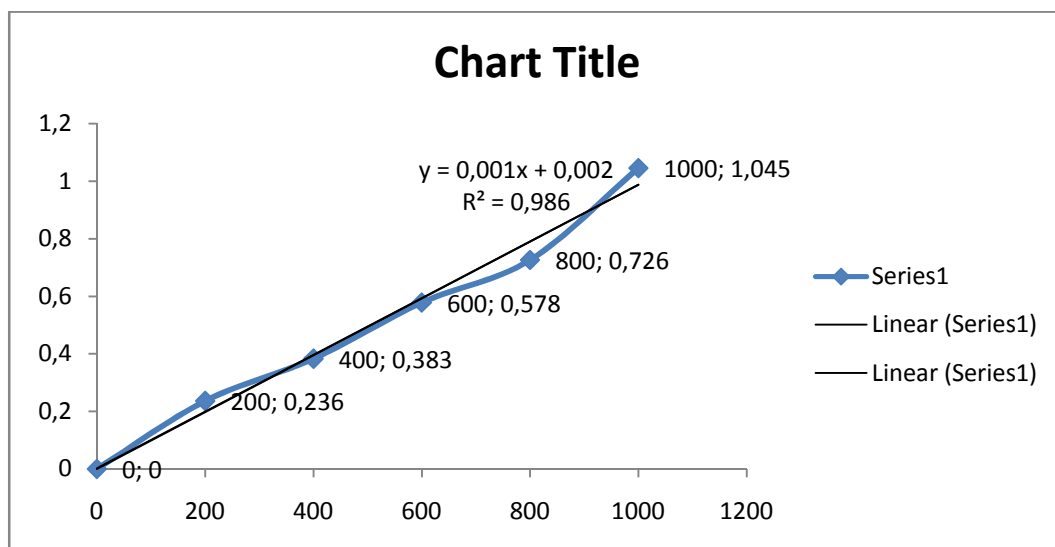
### Lampiran 3. Menentukan Kurva Standar Larutan Glukosa

#### L.3.1 Kurva Standar Larutan Glukosa

Tabel L.3.1 Data Absorbansi Larutan Glukosa Pada  $\lambda$  540 nm

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
200	0,236
400	0,383
600	0,578
800	0,726
1000	1,045

Gambar L.3.1 Grafik Kurva Standar Glukosa





#### Lampiran 4. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase

##### L.4.1 Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Selulase

**Tabel L.5.1 Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Selulase**

No	Nama Isolat	Ulangan			Rata-rata
		1	2	3	
1	Blanko	0	0	0	0
2	PS 2	0,015	0,007	0,026	0,016
3	PS 3	0,008	0,007	0,011	0,009
4	PS 4	0,040	0,031	0,019	0,030
5	PS 8	0,018	0,017	0,017	0,017

##### L.4.2 Menentukan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar selulase dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan kurva standar glukosa sebagai berikut:

Persamaan kurva standar glukosa

Diketahui:  $y = ax + b$

$$y = 0,001x + 0,002$$

$$x = (y - 0,002)/0,001$$

misal absorbansi ekstrak kasar isolat PS 2 0,016

$$y - 0,002 = 0,001x$$

$$\frac{y - 0,002}{0,001} = x$$

$$\frac{0.016 - 0.002}{0.001} = x$$

$$14 \text{ ppm} = x$$

Sehingga, konsentrasi glukosa dari isolat PS 2 adalah 14 ppm

**Tabel L.4.1 Nilai Konsentrasi Gula Reduksi**

No	Kode Isolat	Kadar Gula reduksi (ppm)
1.	PS 2	14
2.	PS 3	7
3.	PS 4	28
4.	PS 8	15

Sedangkan untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar selulase dapat diketahui dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{C}{BM_{\text{produk}} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana: C = Konsentrasi gula reduksi (ppm)

BM = Berat molekul glukosa

t = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

Misal : konsentrasi gula reduksi sebesar 14 ppm maka aktivitas ekstrak kasar selulase adalah

$$\text{Unit aktivitas} = \frac{14 \text{ ppm}}{180 \mu\frac{g}{\mu\text{mol}} \times 40 \text{ menit}} \times \frac{2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$= 0,0039 \mu\text{mol/ mL menit} \approx 3,9 \times 10^{-3} \mu\text{mol/mL menit}$$

Satu unit aktivitas amilase dinyatakan dengan banyaknya mikro mol glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL ekstrak kasar selulase per menit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitas yang diperoleh adalah  $3,9 \times 10^{-3}$  Unit/mL. Data aktivitas ekstrak kasar selulase ditunjukkan pada Tabel L.4.2

**Tabel L.4.2 Nilai Aktivitas Ekstrak Kasar**

No	Kode Isolat	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
1	PS 2	$3,9 \times 10^{-3}$
2	PS 3	$1,9 \times 10^{-3}$
3	PS 4	$7,8 \times 10^{-3}$
4	PS 8	$4,2 \times 10^{-3}$

**Tabel L.4.3 Diameter Zona Bening**

No	Kode Isolat	Diameter Zona Bening (cm)			Rata-Rata (cm)
		I	II	III	
1.	PS 2	0,6	0,1	0,1	0,27
2.	PS 3	0,4	0,1	0,2	0,23
3.	PS 4	0,4	0,1	0,4	0,3
4.	PS 5	0,1	0,1	0,3	0,17
5.	PS 6	0,3	0,1	0,2	0,2
6.	PS 8	0,3	0,1	0,2	0,2

## Lampiran 5 Dokumentasi

### L.5.1 Pengamatan Zona Bening Bakteri Selulolitik Termofilik Dari Sumber Air

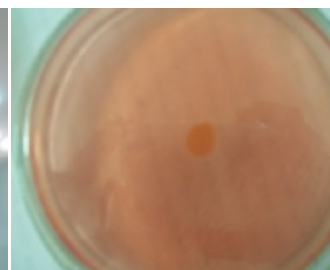
#### Panas Pacet Mojokerto



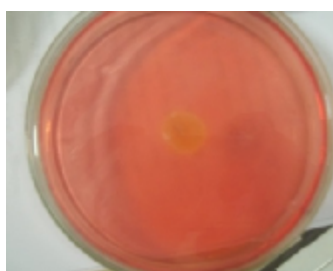
Isolat PS 2 (1)



Isolat PS 2 (2)



Isolat PS 2 (3)



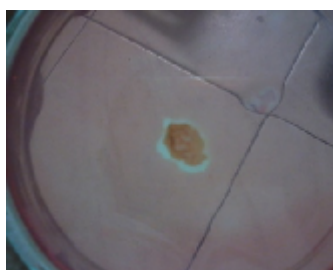
Isolat PS 3 (1)



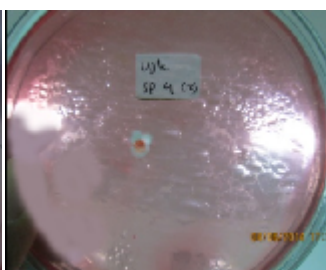
Isolat PS 3 (2)



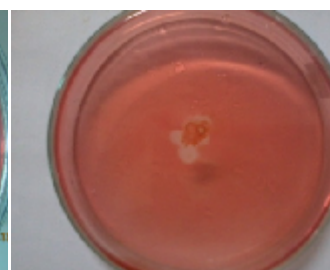
Isolat PS 3 (3)



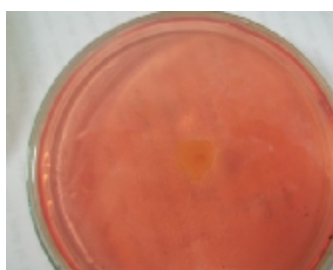
Isolat PS 4 (1)



Isolat PS 4 (2)



Isolat PS 4 (3)



Isolat PS 5 (1)



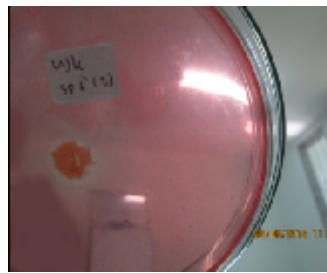
Isolat PS 5 (2)



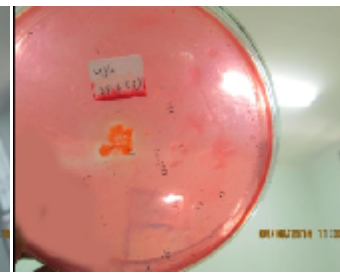
Isolat PS 5 (3)



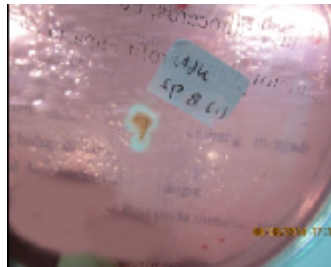
Isolat PS 6 (1)



Isolat PS 6 (2)



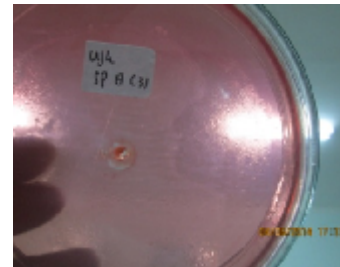
Isolat PS 6 (3)



Isolat PS 8 (1)

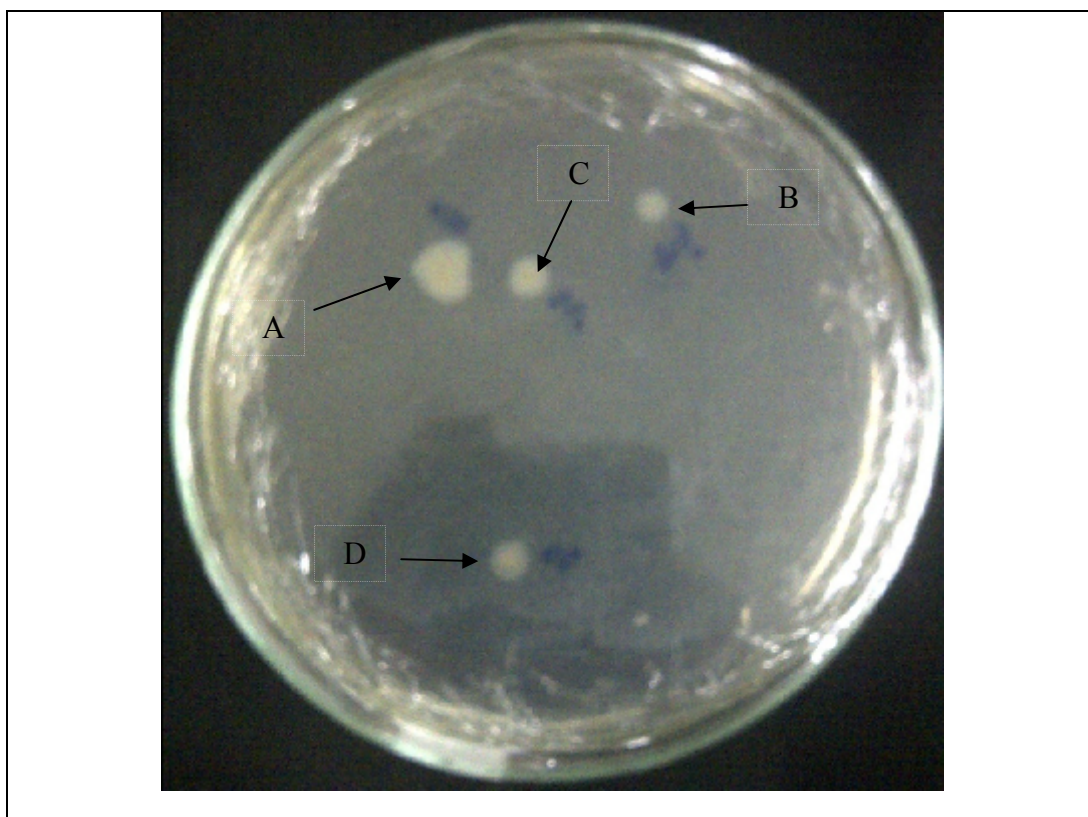


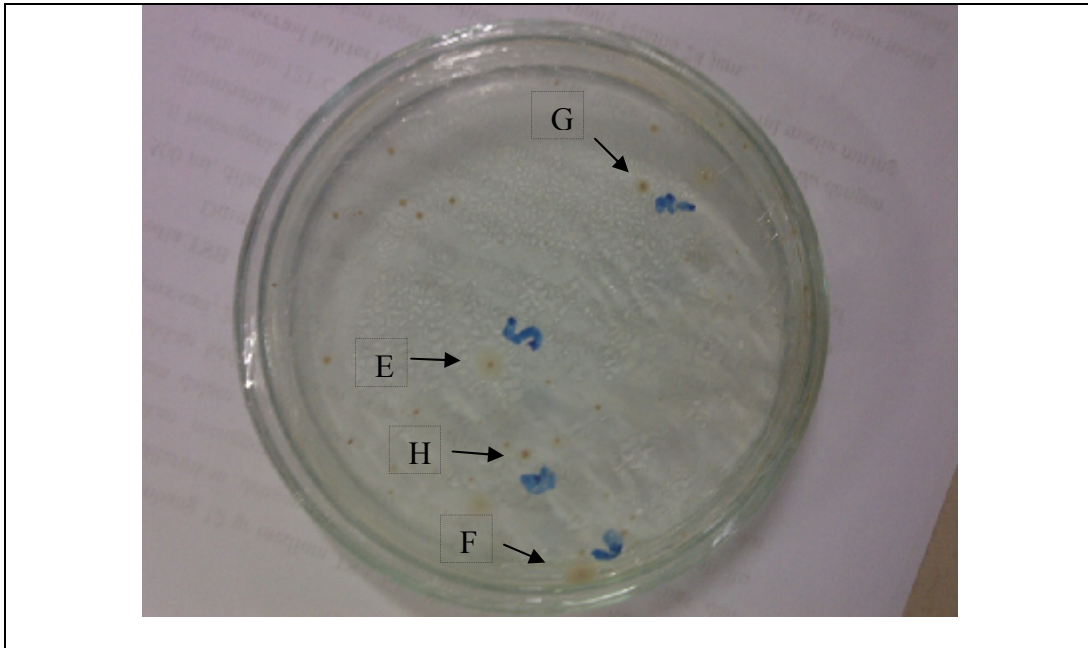
Isolat PS 8 (2)



Isolat PS 8 (3)

#### L.5.2 Hasil Isolasi Bakteri Dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto



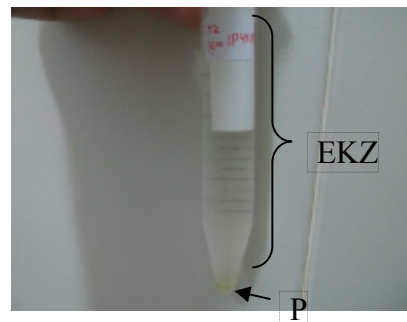


Keterangan : A : Isolat PS 1 ; B : Isolat PS 2 ; C : Isolat PS 3 ; D : Isolat PS 4 ; E : Isolat PS 5 ; F : Isolat PS 6; G : Isolat PS 7 dan H : Isolat PS 8

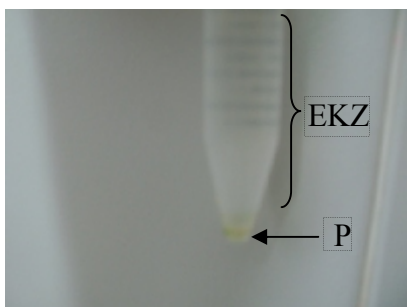
### L.5.3 Proses Uji Aktivitas Enzim Secara Kuantitatif



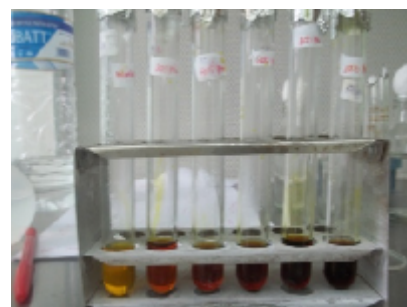
A



B



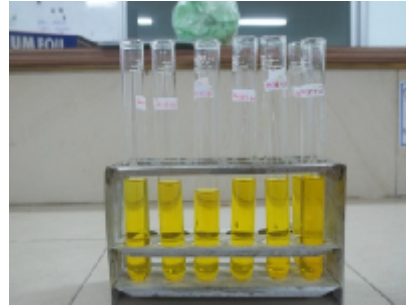
C



D



E



F



G

Keterangan : A : Ekstrak Kasar Enzim sebelum disentrifugasi ; B dan C : Ekstrak Kasar Enzim sesudah disentrifuasi ; D : Ekstrak Enzim setelah diberi reagen DNS ; E : Proses penggodokan ; F : Larutan enzim, DNS, KNa-Tartar 40% dan akuades ; G : Proses pembacaan pada spektrofotometer ; EKZ : Ekstrak Kasar Enzim dan P : Pelet



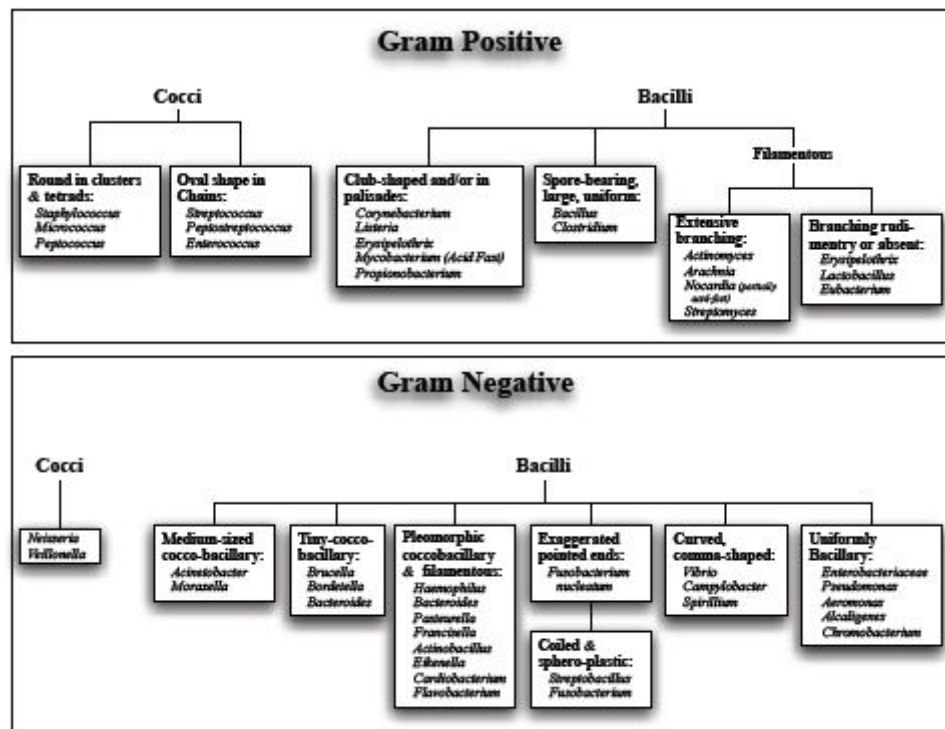
## Lampiran 6 Bagan Pengidentifikasian Spesies Bakteri

### Identification flow charts

Differentiation via Gram stains and cell morphology.

## Gram Stain & Morphological Flowchart

Some Examples

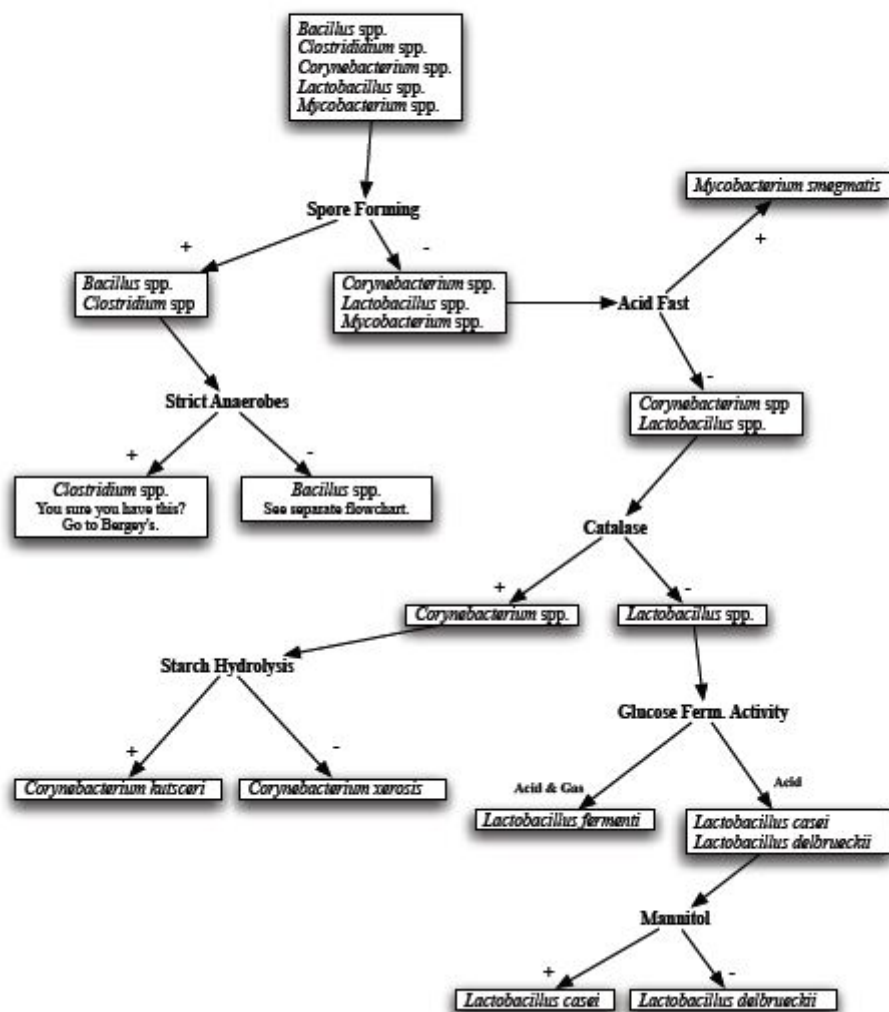




## Identification flow charts

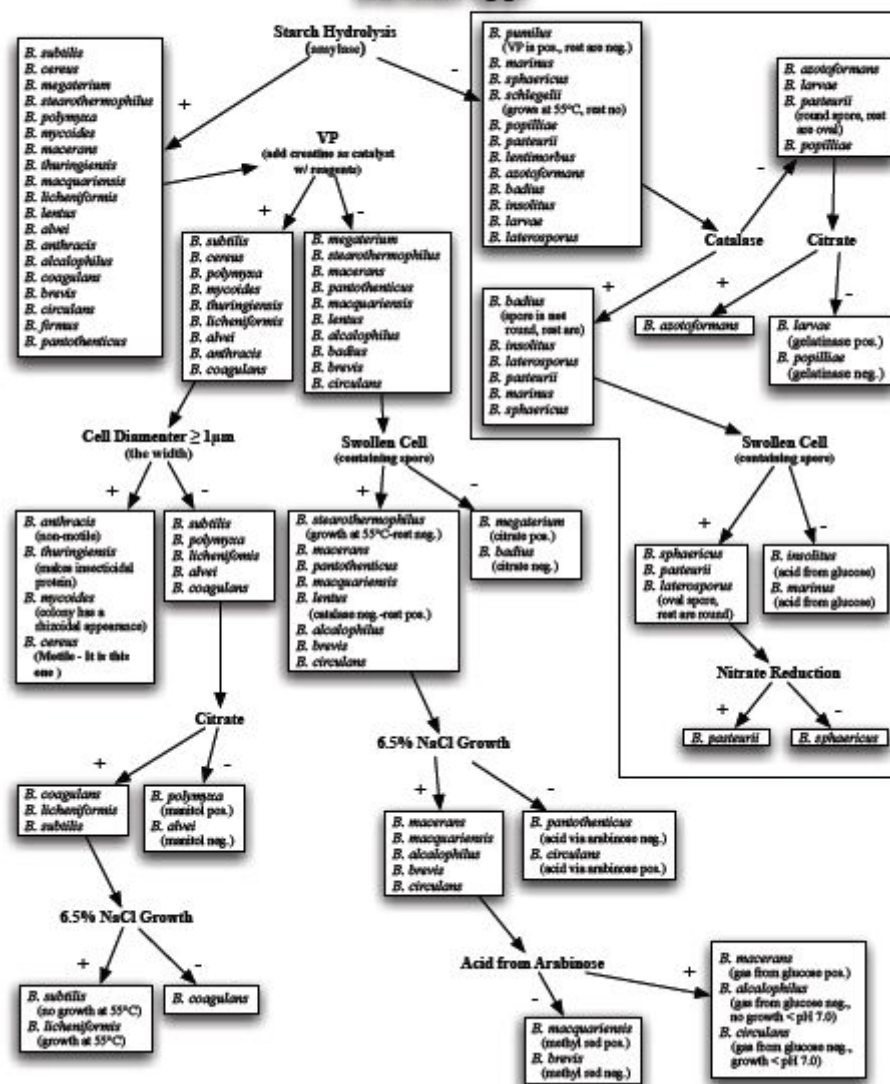
## Gram Positive Rods ID Flowchart

## Gram Positive Rods



## Identification flow charts

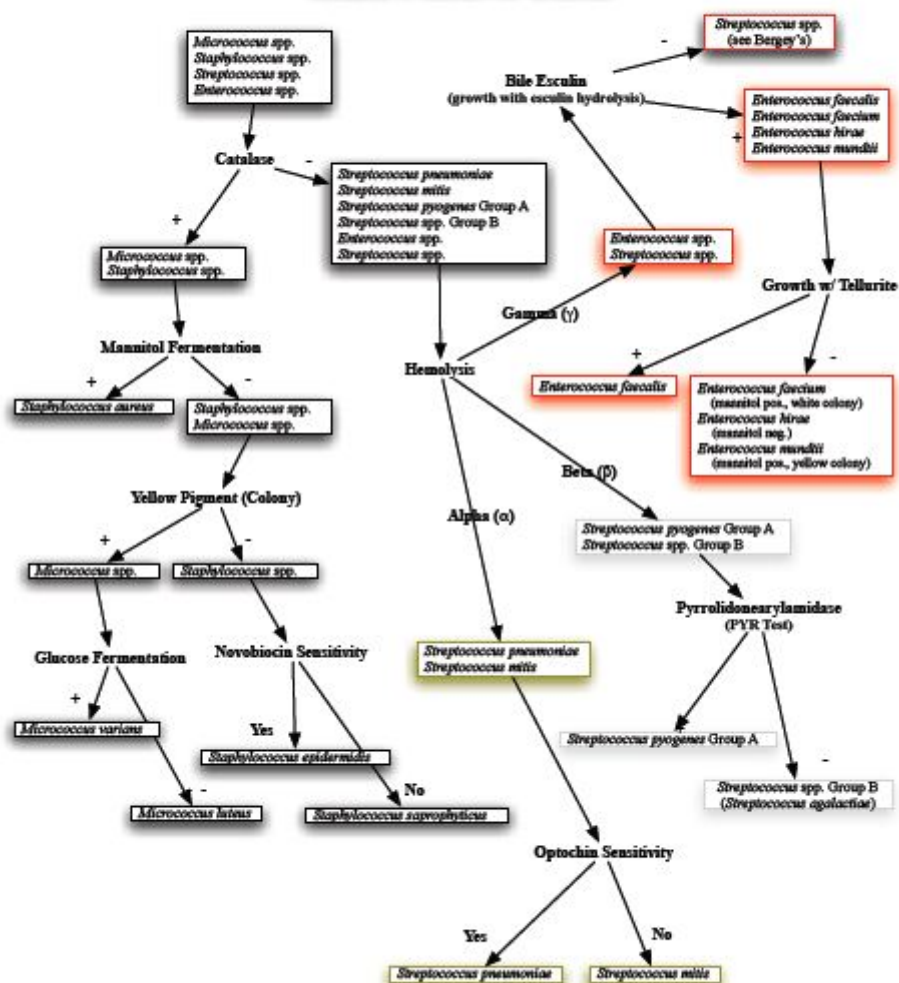
## Bacillus spp. ID Flowchart

*Bacillus* spp.

## Identification flow charts

## Gram Positive Cocci ID Flowchart

## Gram Positive Cocci





**KEMENTERIAN AGAMA RI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI**  
**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**Jl. Gajayana No. 50 Malang (0341) 558933 Fax. (0341) 558933**

### BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Arifatul Mukminin  
 NIM : 10620049  
 Fakultas/ Jurusan : Sains dan Teknologi /Biologi  
 Judul Skripsi : Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Sumber Air Panas  
 Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Selulase  
 Pembimbing : Anik Maunatin, M.P

No.	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1.	8 Januari 2014	Pengajuan Judul Skripsi	1. <i>[Signature]</i>
2.	22 Januari 2014	Konsultasi BAB I	2. <i>[Signature]</i>
3.	3 Februari 2014	Revisi BAB I	3. <i>[Signature]</i>
4.	10 Februari 2014	ACC BAB I	4. <i>[Signature]</i>
5.	3 Maret 2014	Konsultasi BAB II, III	5. <i>[Signature]</i>
6.	10 Maret 2014	Revisi BAB II, III	6. <i>[Signature]</i>
7.	19 Maret 2014	Revisi BAB II, III	7. <i>[Signature]</i>
8.	28 Maret 2014	ACC BAB II, III	8. <i>[Signature]</i>
9.	24 September 2014	Konsultasi BAB IV	9. <i>[Signature]</i>
10.	29 September 2014	Revisi BAB IV	10. <i>[Signature]</i>
11.	2 Oktober 2014	Revisi BAB IV	11. <i>[Signature]</i>
12.	13 Oktober 2014	ACC Skripsi	12. <i>[Signature]</i>
13.	03 Desember 2014	ACC Keseluruhan	13. <i>[Signature]</i>

Malang, 04 Desember 2014  
 Mengetahui,  
 Ketua Jurusan Biologi



*[Signature]*  
Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
 NIP. 19741018 200312 2 002



**KEMENTERIAN AGAMA RI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI**  
**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**Jl. Gajayana No. 50 Malang (0341) 558933 Fax. (0341) 558933**

### BUKTI KONSULTASI AGAMA

Nama : Arifatul Mukminin  
 NIM : 10620049  
 Fakultas/ Jurusan : Sains dan Teknologi /Biologi  
 Judul Skripsi : Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Sumber Air Panas  
 Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Selulase  
 Pembimbing : Mujahidin Ahmad, M.Sc

No.	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1.	3 Maret 2014	Konsultasi BAB I,II, III	1.
2.	12 Maret 2014	Revisi BAB I,II,III	2.
3.	24 Maret 2014	ACC BAB I,II,III	3.
4.	29 September 2014	Konsultasi BAB IV	4.
5.	6 Oktober 2014	Revisi BAB IV	5.
6.	20 Oktober 2014	ACC Skripsi	6.
7.	7 November 2014	ACC Keseluruhan	7.

Malang, 16 Desember 2014

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P

NIP. 19741018 200312 2 002